

令和 6 年 5 月 17 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06181

研究課題名(和文)細胞接着制御因子Rap1による新たな好中球細胞死制御メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of a new neutrophil cell death mechanism by the cell adhesion regulator Rap1

研究代表者

上岡 裕治 (Kamioka, Yuji)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：50511424

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、好中球特異的可視化マウスや好中球特異的ノックアウトマウスの作出を予定通り完了した。しかし、本学の二光子レーザー顕微鏡などの故障により予定していたin vivoおよびin vitroでの蛍光イメージング実験を達成できなかった。NETosisの定量的画像評価に関しては再現性やデータ取得方法そのもの、解析方法に課題はあるものの、画像AI解析技術の進歩により市販ソフトで大量の画像を学習させ、分類させることが可能となりつつある。課題申請当時に比べると画像分類プログラムを独自開発する利点はほぼなくなったが、生理的な血管内の血流を模倣した条件下での解析を進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NETosisに関する研究報告は増加傾向であり、その分子メカニズムやいくつかの病態との関連についても新しい知見が増えてきている。一方で、生体または生体に近い環境下でNETosisを評価する手法は未だに不十分な状況である。本研究成果では血流環境下での細胞接着シグナルと細胞動態を評価することができた。血流流れ刺激を含めた新しい視点により、NETosis関連疾患の解明や創薬へ繋げられる可能性が出てきた。

研究成果の概要(英文)：In this research project, the generation of neutrophil-specific visualization mice and neutrophil-specific knockout mice were completed as planned. However, due to the malfunction of our two-photon laser microscope and other equipments, I was unable to achieve the planned in vivo and in vitro fluorescence imaging experiments. While there are challenges and problems in the reproducibility, data acquisition methods, and analysis methods for the quantitative image evaluation of NETosis, the advancement of image AI analysis technology is making it possible to train and classify a large number of images by commercially available softwares. Compared to the time of this project application, the benefits of developing an image classification program with my own hands have almost disappeared. But I have advanced the analysis under shear flow conditions that mimic physiological blood flow within blood vessels.

研究分野：細胞生物学

キーワード：shear flow integrin NETosis Rap1 mechanical stress neutrophil

### 1. 研究開始当初の背景

好中球細胞死「NETosis」は粘着性クロマチン構造体( Neutrophil Extracellular Traps: NETs )を放出し、病原体を捕捉・排除する生体防御機能の一つである。さらに、NETosis は生体防御のみならず、自己免疫疾患、癌といった様々な病態形成に関与する。近年では、新型コロナウイルス感染症( COVID-19 )に起因する血栓形成にも関与することが報告されている( *Thromb. Res.* 191: 26–27 (2020) )。この NETosis の分子機序は未だ明らかになっていないが、Apoptosis などのプログラム細胞死とは異なることが報告された( *Nat. Rev. Immunol.* 18(2):134–147 (2018) )。加えて、好中球と血小板・血管内皮細胞との「接着」が NETosis に必要であるという報告がある( *Front. Immunol.* 7: 453 (2016) )。

細胞接着分子の一つ「インテグリン」は好中球の血管内皮への接着や細胞遊走を担う。しかし、インテグリンは脱顆粒、貪食、細胞増殖といった細胞接着とは無関係に見える細胞機能にも重要な役割を果たす( *Annu. Rev. Immunol.* 27:339-62 (2009) )。

申請者は Rap1 の活性化がインテグリンを介する T 細胞のローリング・停止接着に必要であることを研究しているが、好中球においてはセレクチン - PSGL を介するローリングとインテグリンを介する停止接着が Rap1 によって制御されていることが知られている( *Front. Immunol.* 3:157 (2012) )。そこで申請者は「インテグリンを介する接着シグナルが NETosis を制御している」という仮説のもと、二光子励起顕微鏡を用いてマウス炎症モデルの生体イメージングを行い、NETosis 誘導時の好中球 - 血小板凝集を *in vivo* で確認した。( 図 1 )

また、申請者の所属研究室では、Rap1 結合分子 RAPL、Mst1 キナーゼおよびインテグリン活性化分子 Kindlin-3 による Rap1 シグナルと「小胞輸送」との関連を報告している( *Mol. Cell Biol.* 37(8) e00424-16 (2017) )。小胞輸送は NETosis で見られるクロマチン脱縮合前後の過程で重要である。Mst1 キナーゼは接着シグナルのみならず、ファゴソームでの ROS 産生を担うことが近年報告されたが、ROS 産生は NETosis 誘導初期に必要である( *Nat. Immunol.* 16(11):1142-52 (2015) )。以上のように、Rap1 が制御する細胞接着シグナルから NETosis へのシグナル経路が断片的に示されてきた。

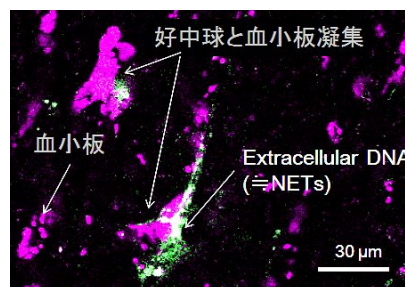


図 1 二光子顕微鏡を用いた LPS 投与マウス生体肺イメージング

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、Rap1 シグナル依存的な NETosis 制御メカニズムの解明である。インテグリンが NETosis に必要であることは既に報告されている。また、申請者が行った予備実験では、Rap1 欠損好中球で NETosis が低下した。しかし、関与するインテグリンの種類( MAC-1、LFA-1 など)や細胞接着から NETosis への細胞内シグナル経路は以前不明である。また、Rap1 の下流因子 Mst1 は細胞接着のみならず、小胞輸送、ROS 産生に関与することから、細胞接着とは別に、Mst1 が NETosis を制御している可能性もある。さらに、Mst1 は他の細胞死 Apoptosis を正に制御することが報告されていることから、Mst1 が Apoptosis と NETosis を切り替えている可能性について調べる必要がある( 図 2 )。

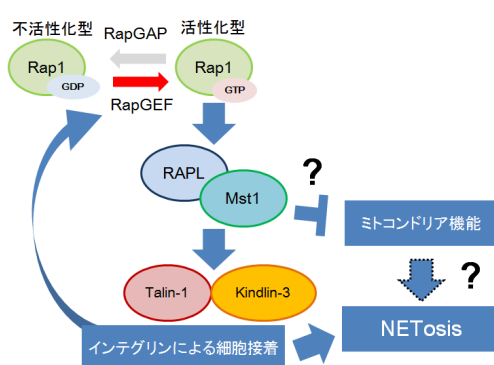


図 2 細胞接着を制御する Rap1 シグナルと NETosis

### 3. 研究の方法

#### Rap1 シグナル依存的な NETosis 制御メカニズムの解明

NETosis ( NETs の放出 ) の誘導には、IL-8、LTB4 といった内因性因子( DAMPs )と、LPS や Zymosan といった病原体由来因子( PAMPs )があり、刺激因子の種類によって NETosis へのシグナルプロセスが異なる。Rap1 シグナル分子( Rap1b、Talin-1、Kindlin-3、Mst1 )のノックアウトマウス由来好中球を用いて、各刺激因子に対する NETosis の反応( 時間経過 )を蛍光顕微鏡観察し、比較する。また、血流を模した「流れ負荷( shear stress )実験系」を用いて、固相化接着分子基質( ICAM-1、VCAM-1 など)による NETosis の違いを調べ、関与するインテグリン種を同定する。in vitro で確認した刺激因子・接着分子基質による違いを in vivo でも評価するため、各種シグナル阻害剤、阻害抗体を投与したマウスを用いて二光子励起顕微鏡によ

る生体イメージングを行う。

### Mst1 依存的な NETosis 制御メカニズムの解明

Rap1 下流因子の Mst1 には細胞接着のみならず小胞輸送やエネルギー代謝など多面的役割があり、免疫細胞の活性化に重要な役割を担っている (*Front. Immunol.* 6;11:733 (2020))。またプログラム細胞死である Apoptosis では、caspase 依存的な Mst1 の C 末端切断と核内移行が報告されており (*Biochemistry.* 55(39): 5507–5519 (2016)) Apoptosis と NETosis との切替に Mst1 が関与する可能性がある。そこで、上述のノックアウトマウス好中球の解析に加えて、蛍光顕微鏡観察によって NETosis 誘導時での Mst1 の局在変化を捉える。またエネルギー代謝、ROS 産生能 (ミトコンドリア機能、動態) を Mst1 欠損好中球と野生型で比較し、Mst1 依存的な NETosis 制御メカニズムを明らかにする。

### NETosis の定量的自動解析と予測の試み

NETosis を解析するには、放出された NETs (DNA またはシトルリン化ヒストンなど) の面積や輝度を測定する手法が一般的である。しかし実際に NETs を蛍光顕微鏡観察してみると、dish 底面に付着する NETs もあれば、培地中に拡散する NETs もある。また、NETs の広がりや大きさはさまざまであることが分かる。さらに、Apoptosis と「NETosis の手前」を目視で厳密に区別することは困難であり、NETosis を定量的に評価する手法は未だ確立されていないと言える。そこで本研究では、機械学習 (AI) を活用し、これまで恣意的だった NETosis の判定を定量的、自動的に解析する試みを進める (図 3)。

具体的には画像ビックデータを用いた機械学習を導入し、MATLAB ソフトウェアで形態評価プログラム策定する。【形態カテゴリー】と頻度分布の解析によって、細胞形態変化、NETosis の判定を行う。必要に応じて、細胞膜、細胞骨格等を染色し、細胞極性パラメータとする。NETosis 時に観察される細胞外 DNA の拡散様式も複数に分類する。最終的には、NETosis につながる事前の細胞形態変化を捉え、NETosis を予測する。

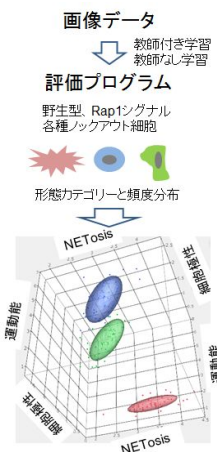


図 3 AI を用いた細胞形態、NETosis の定量解析、分類

## 4. 研究成果

好中球特異的 Cre マウスとしてよく用いられる LysM-Cre マウスとの交配により、Rap1 シグナル分子である Talin1、Mst1 の好中球特異的ノックアウトマウスをほぼ予定通り作出した。しかし、少なくとも Talin1 に関してはマウス好中球マーカーである Ly-6G 陽性または Gr-1 陽性の population において、Talin1 タンパク質が一部残存することが判明した。この原因の一つとして、Cre の活性効率の問題を考えた。そこで、LysM-Cre 陽性の population を好中球分画として回収する方法に切り替え、flox-tdTomato マウスとの交配で好中球特異的に蛍光タンパク質 tdTomato を発現するマウスを作出し、実際に LysM-Cre が作用している = 光っている好中球を実験に用いた。また、骨髄からの細胞調整では未分化好中球を含むために Cre による遺伝子発現阻害が不十分だと考え、末梢 (腹腔) からの成熟好中球回収法を試みた。Rap1b は LysM と同じ 10 番染色体にあるため LysM-Cre が使えない。そこで、CAG-Cre マウス卵に残存する Cre によって一過的に Rap1b を欠失させることで目的マウスを取得した。しかし、コロナ禍のマウス数削減により継続して実験に用いることはできなかった。また、二光子顕微鏡の故障により予定していた in vivo イメージング実験もできなかった。

先述の各種遺伝子改変マウスから用意した好中球をイメージングフローサイトメーター ImageStream で撮像し、好中球細胞死のデータを蓄積する予定であったが、こちらも装置の故障が続き撮像ができなかった。また、画像データから好中球細胞死の特徴量を抽出するプログラム作成を進めていたが、近年の AI (人工知能) およびその中に含まれる機械学習、Deep Learning の進歩が目覚ましく、コマースベースで利用できるソフトウェア数が大幅に増加した。MATLAB や ImageJ/Fiji などで独自でソフト開発するメリットは申請当初に比べてなくなると判断し、ソフトの開発は中止した。

並行して LPS などの各刺激因子に対する NETosis の反応 (時間経過) を蛍光顕微鏡観察し、比較する in vitro 実験を並行して進めていたが、同様の研究事例がいくつか報告され、一般的なタイムラプス撮影とその解析では新規性を見出すことは困難だと判断した。一方、NETs 形成には血管内外での力学的な因子が必要であることが申請当初から示唆されていたものの、その難易度から研究事例は少なかった。そこで血流を模した「流れ負荷 (shear stress) 実験系」を用いて、固相化接着分子基質 (ICAM-1、VCAM-1、L-selectin、P-selectin) を用いた実験に本研究の重点を変更した。好中球では刺激なし、固相化基質なしでも細胞接着が見られること、また細胞精製の時間や処理方法の違いが結果に大きく影響してしまうことなどを考慮し、まずは T リンパ球での解析を進め、流れ負荷実験系の立ち上げとその解析手法の開発を優先した。

これまでの成果を Cell Reports (2023) Jun 27;42(6):11258 などに報告した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 5件）

|   |                               |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名<br>Kamioka Yuji, Ueda Yoshihiro, Kondo Naoyuki, Tokuhiko Keizo, Ikeda Yoshiki, Bergmeier Wolfgang, Kinashi Tatsuo  | 4. 巻<br>42                    |
| 2. 論文標題<br>Distinct bidirectional regulation of LFA1 and 4 7 by Rap1 and integrin adaptors in T?cells under shear flow  | 5. 発行年<br>2023年               |
| 3. 雑誌名<br>Cell Reports  | 6. 最初と最後の頁<br>112580 ~ 112580 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.celrep.2023.112580   | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>該当する                  |
| 1. 著者名<br>Ueda Yoshihiro, Higasa Koichiro, Kamioka Yuji, Kondo Naoyuki, Horitani Shunsuke, Ikeda Yoshiki, Bergmeier Wolfgang, Fukui Yoshinori, Kinashi Tatsuo   | 4. 巻<br>26                    |
| 2. 論文標題<br>Rap1 organizes lymphocyte front-back polarity via RhoA signaling and talin1  | 5. 発行年<br>2023年               |
| 3. 雑誌名<br>iScience  | 6. 最初と最後の頁<br>107292 ~ 107292 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.isci.2023.107292   | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>該当する                  |
| 1. 著者名<br>Horitani Shunsuke, Ueda Yoshihiro, Kamioka Yuji, Kondo Naoyuki, Ikeda Yoshiki, Naganuma Makoto, Kinashi Tatsuo  | 4. 巻<br>14                    |
| 2. 論文標題<br>The critical role of Rap1-GAPs Rasa3 and Sipa1 in T cells for pulmonary transit and egress from the lymph nodes  | 5. 発行年<br>2023年               |
| 3. 雑誌名<br>Frontiers in Immunology   | 6. 最初と最後の頁<br>01-13           |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3389/fimmu.2023.1234747   | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-                     |
| 1. 著者名<br>Fukuhara Takataro, Ueda Yoshihiro, Lee Sung-II, Odaka Tokifumi, Nakajima Shinsuke, Fujisawa Jun-Ichi, Okuma Kazu, Naganuma Makoto, Okazaki Kazuichi, Kondo Naoyuki, Kamioka Yuji, Matsumoto Mitsuru, Kinashi Tatsuo | 4. 巻<br>24                    |
| 2. 論文標題<br>Thymocyte Development of Humanized Mice Is Promoted by Interactions with Human-Derived Antigen Presenting Cells upon Immunization  | 5. 発行年<br>2023年               |
| 3. 雑誌名<br>International Journal of Molecular Sciences   | 6. 最初と最後の頁<br>11705 ~ 11705   |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3390/ijms241411705  | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-                     |

|  |                               |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名<br>Nguyen Linh Manh, Kanda Akira, Kamioka Yuji, Tokuhiko Keizo, Kobayashi Yoshiki, Yun Yasutaka, Bui Dan Van, Chu Hanh Hong, Le Nhi Kieu Thi, Suzuki Kensuke, Mitani Akitoshi, Shimamura Akihiro, Fukui Kenta, Dombrowicz David, Iwai Hiroshi | 4. 巻<br>Online ahead of print |
| 2. 論文標題<br>Mouse eosinophil associated ribonuclease 2 exacerbates the allergic response  | 5. 発行年<br>2024年               |
| 3. 雑誌名<br>Allergy  | 6. 最初と最後の頁<br>1-5             |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1111/all.16061  | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>該当する                  |

[学会発表] 計9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Yuji Kamioka, Yoshihiro Ueda, Naoyuki Kondo, Yoshiki Ikeda, Tatsuo Kinashi   |
| 2. 発表標題<br>Subsecond Rap1 activation by outside-in signaling of LFA1/ICAM1 interactions strengthens L-selectin mediated rolling of T cells. |
| 3. 学会等名<br>The 51st Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology   |
| 4. 発表年<br>2022年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Naoyuki Kondo, Yuji Kamioka, Yoshiki Ikeda, Yoshihiro Ueda, Tatsuo Kinashi  |
| 2. 発表標題<br>Distinct binding properties of integrin adaptors talin1 and kindlin-3 to LFA1 and 4 integrins modulate adhesive responses in static and shear-flow conditions |
| 3. 学会等名<br>The 51st Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology  |
| 4. 発表年<br>2022年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Yoshihiro Ueda, Koichiro Higasa, Yuji Kamioka, Naoyuki Kondo, Shunsuke Horitani, Yoshiki Ikeda, Takataro Fukuhara, Yoshinori Fukui, Tatsuo Kinashi |
| 2. 発表標題<br>Rap1 facilitates cell polarization via RhoA signaling in T cells   |
| 3. 学会等名<br>The 51st Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology   |
| 4. 発表年<br>2022年   |

|   |
|---|
| 1 . 発表者名<br>Shunsuke Horitani, Yoshihiro Ueda, Yuji Kamioka, Naoyuki Kondo, Yoshiki Ikeda, Takataro Fukuhara, Makoto Naganuma, Tatsuo Kinashi |
| 2 . 発表標題<br>The critical role of Rap1GAPs in T cell recirculation and egress from lymph node  |
| 3 . 学会等名<br>The 51st Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology  |
| 4 . 発表年<br>2022年  |

|  |
|--|
| 1 . 発表者名<br>Y. Kamioka, Y. Ueda, N. Kondo, T. Kinashi  |
| 2 . 発表標題<br>Differential requirement of Rap1 and integrin adaptors for distinct modalities of T cell adhesion under shear flow |
| 3 . 学会等名<br>The 50th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology   |
| 4 . 発表年<br>2021年   |

|  |
|--|
| 1 . 発表者名<br>Y. Ueda, K. Higasa, Y. Kamioka, N. Kondo, T. Kinashi,                    |
| 2 . 発表標題<br>Rap1 facilitates T cell polarity via spatial regulation of MLC and ARAP1 |
| 3 . 学会等名<br>The 50th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology           |
| 4 . 発表年<br>2021年   |

|  |
|--|
| 1 . 発表者名<br>Yuji Kamioka, Yoshihiro Ueda, Naoyuki Kondo, Tatsuo Kinashi  |
| 2 . 発表標題<br>Distinct bidirectional regulation of integrins by Rap1, talin1 and kindlin-3 in T cells under shear flow |
| 3 . 学会等名<br>The 52nd Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology   |
| 4 . 発表年<br>2024年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Shunsuke Horitani, Yoshihiro Ueda, Yuji Kamioka, Naoyuki Kondo, Makoto Naganuma, Tatsuo Kinashi          |
| 2. 発表標題<br>Rap1-GAPs Rasa3 and Sipa1 are required for pulmonary transit and egress from the lymph nodes in T cells. |
| 3. 学会等名<br>The 52nd Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology   |
| 4. 発表年<br>2024年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Yoshihiro Ueda, Koichiro Higasa, Yuji Kamioka, Naoyuki Kondo, Shunsuke Horitani, Yoshiki Ikeda, Wolfgang Bergmeier, Yoshinori Fukui, Tatsuo Kinashi |
| 2. 発表標題<br>Rap1-Talin1 axis facilitates front-back cell polarity independent of talin1 binding to integrins in lymphocytes                                     |
| 3. 学会等名<br>The 52nd Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology  |
| 4. 発表年<br>2024年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

|   |
|---|
| 関西医科大学 附属生命医学研究所 分子遺伝学部門<br><a href="http://www3.kmu.ac.jp/molgent/">http://www3.kmu.ac.jp/molgent/</a><br><br>細胞接着分子インテグリンごとに異なる活性化メカニズムを発見<br><a href="https://www.kmu.ac.jp/news/laaes7000000p1ar-att/20230622Press_Release.pdf">https://www.kmu.ac.jp/news/laaes7000000p1ar-att/20230622Press_Release.pdf</a><br>関西医科大学 プレスリリース |
|---|

|                           |                       |    |
|---------------------------|-----------------------|----|
| 6. 研究組織                   |                       |    |
| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

## 8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関                  |                            |                           |  |
|---------|--------------------------|----------------------------|---------------------------|--|
| 米国      | UNC-Chapel Hill          |                            |                           |  |
| フランス    | Inserm                   | University of Lille        | Institut Pasteur de Lille |  |
| ベトナム    | Hanoi Medical University | National Children Hospital |                           |  |